

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**GAJDÓCSI ERZSÉBET EMÍLIA**

**Mosonmagyaróvár  
2014**

**Nyugat – magyarországi Egyetem  
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar**

**Állattudományi Intézet**

**Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Iskola**

**Doktori iskola vezetője  
Dr. Szabó Ferenc**

**Az állati termék termelés nemesítési és tartástechnológiai  
vonatkozásai program**

**Programvezető  
Kovácsné Dr. Gaál Katalin**

**Témavezető  
Dr. Bali Papp Ágnes  
Dr. Macháty Zoltán (Purdue University)**

**SZAPORODÁSBIOLOGIÁHOZ KÖTHETŐ GÉNEK  
ELEMZÉSE KÜLÖNBÖZŐ SERTÉS FAJTÁKBAN**

**GAJDÓCSI ERZSÉBET EMÍLIA**

**Mosonmagyaróvár**

**2014**

## 1 Bevezetés

A sertés ágazat hazánkban hanyatlóban van, de a sertés értékes húsát és a belőle készült termékeket nem nélkülözheti a magyar konyha. A génmegőrzés igen divatos és aktuális témává vált, melynek keretei kiterjednek a mangalica fajtára is. E hazai sertés fajta tenyésztésének újjáéledésének lehetünk szemtanúi napjainkban. Ahhoz, hogy egy fajtát megőrizhessünk genetikai szinten, több eszköz áll a rendelkezésünkre: génbankok, fajtafenntartó törzstenyészetek és persze a molekuláris genetika különböző vívmányainak alkalmazása is. A PCR-RFLP módszer egy olyan alapvető technika, mellyel az egyes egyedekről alkothatunk pontosabb képet. A Real-Time PCR segítségével feltárhatjuk az egyes szövetek, szervek, vagy akár sejtek génexpresszióját, mely tudás birtokában jobban megérthetjük a bennük lezajló folyamatokat és az öröklődést, valamint a környezeti hatásokat is.

A petesejtek parthenogenetikus aktiválása a transzgenikus állatok előállításának is fontos lépése. Segítségével pontosíthatjuk a termékenyítésről és embrionális fejlődésről szerzett tudásunkat.

A parthenogenetikusán aktivált emberi petesejtekből nyerhetők donorjaik genetikai kódjával rendelkező őssejtek, melyek transzplantációs célra később felhasználhatók, bár a tudomány gyors fejlődése szerint már szinte bármilyen testi sejt „újraprogramozható” és indukált pluripotens őssejtekké alakítható. Az emberhez felépítésében és genetikailag is közel álló sertés emberi betegségek modell állataként szolgálhat.

## 2 Célkitűzések

Az értekezésben bemutatott kísérletek céljai:

- A különböző sertés fajták prolaktin receptor gén polimorfizmusának és a különböző allélok alomszámra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A sertés petesejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációját befolyásoló gének expressziójának vizsgálata: SERCA 2, STIM 2, Orai 2 és Syntaxin 5.
- A különböző fejlődési állapotú sertés petesejtek  $\text{Ca}^{2+}$  visszaeresztő képességének analízise:  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes közegben CPA-val (ciklopiazonsav) történő blokkolást, majd emelt mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazó oldat hozzáadását követően.

### 3 Anyag és módszer

#### 3.1 Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa

A disszertációban leírt prolaktin receptor gén vizsgálathoz a különböző tenyészetekből származó mangalicákból szórtüsző-, illetve vágóhídról származó fülminták kerültek felhasználásra. A DNS kinyerése a Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit segítségével történt.

A PCR reakció az alábbi primerekkel lett végrehajtva:

PRLR4 5' CGG CCG CAG AAT CCT GCT GC 3'

PRLR5 5' ACC CCA CCT TGT AAC CCA TCA TCC 3'

A kapott termék 2 %-os agaróz gélen, etidium-bromid hozzáadásával lett ellenőrizve.

A PCR termék ALUI restriktációs enzim emésztését követően a fragmenteket 3 %-os agaróz gélen etidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá.

A statisztikai elemzés IBM SPSS programmal, Tukey's Standardized Range és ANOVA teszttel történt.

#### 3.2 A sertés petesejtek $Ca^{2+}$ – oszcillációját befolyásoló gének expressziója

A kísérletekben felhasznált sertés petesejtek az Indiana Packers Co. Delphi vágóhídjáról származó petefészkekből voltak kinyerve. A 3-6 mm átmérőjű tüszőkből egy fecskendő és egy 18 G tű segítségével voltak aspirálva a petesejtek.

Az in vitro maturáltatás 44 órán át LH és FSH hormonnal, valamint EGF-el (Epidermal Growth Factor = Epidermális Növekedési Faktor) kiegészített TCM (Tissue Culture Medium 199-re alapozott sertés IVM oldat) oldatban történt.

A GV (germinal vesicle= germinális vezikulum) állapotú petesejtek a maturáltatás előtt, az MI (Metafázis I) fejlettségi állapotú petesejtek pedig a maturáltatás kezdete után 22 órával kerültek gyűjtésre.

A kísérletek háromszoros ismétlésben voltak végrehajtva, csoportonként és kísérletenként 2-2 RT-PCR ismétlésben. Az első kísérletben a mintákat 93 GV, 92-92 MI és MII fázisú, a másodikban 70, a harmadikban 80 petesejt képezte és az ezekből nyert mRNS-ről írt cDNS került felhasználásra a négy génből, egy kontrol génből és egy negatív kontrolból álló RT-PCR-hoz.

Az NCBI adatbázisát használtuk a génszekvenciák kereséséhez (Az alábbi gének kerültek kiválasztásra: STIM2: BP167477, Orai2 FD639141.1, SERCA2: NM\_213865.1, STX5: BP159925), a primertervezéshez a Primer3 oldalt alkalmaztuk; a primereket (1. táblázat) az IDT Inc.-től rendeltük meg.

1. táblázat. Az alkalmazott primerek szekvenciája.

Primer	Szekvencia
<b>SERCA2 F</b>	5'-TCTGACTTTCGTTGGCTGTG-3'
<b>SERCA2 R</b>	5'-GTATATTGCCCGTCCCTCCT-3'
<b>STIM2 F</b>	5'-TGACCGGAGTCACAGACAGA-3'
<b>STIM2 R</b>	5'-GAAGTGCATCTGGAACAGACC-3'
<b>Orai2 F</b>	5'-CGGTCACCTACCCGGACT-3'
<b>Orai2 R</b>	5'-AGCAGAGCAGCACAACCTCT-3'
<b>STX5 F</b>	5'-GCTGGAGAAGCTGACAATCC-3'
<b>STX5 R</b>	5'-CTCAATGTTCTGCATGGTGTCT-3'

A petesejtekből hírvívő RNS-t izoláltunk, melyet az Invitrogen Co. Dynabeads (mRNA DIRECT Micro Kit) segítségével hajtottunk végre. A Real-Time PCR reakciókat a cDNS-sel Bio-Rad készülékkel végeztük.

A petesejtekből nyert cDNS plazmid vektorral *E. coli* baktériumokba lett juttatva Topo TA Cloning kit (Invitrogen) segítségével. A baktériumokat 37°C-on ampicillines LB agaron tenyésztettük egy éjszakán át, majd inokulálta a plazmidokat hordozó telepeket és folyékony LB tápoldatban 37°C-on rázóasztalos inkubátorban tenyésztettük egy újabb éjszakán át. Az adott gént hordozó plazmidokat a Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével kinyertük az *E. coli* baktériumokból. ECORI enzimes emésztés után agaróz gélen néztük meg, hogy beépült-e a kívánt gén és annak szekvenciáját ellenőriztük. A génszakaszon belül rövidebb szakaszokra terveztünk primereket (2. táblázat). A plazmidokból kinyert DNS-ből standard sort csináltunk a RT-PCR-hoz.

2. táblázat. Az RT-PCR-hoz használt primerek.

Primer	Szekvencia
<b>ORAI2 F</b>	5'-CACAACTCAACTCGGTCAA-3'
<b>ORAI2 R</b>	5'-CTGCCAGGAAGAGCAGTGT-3'
<b>SERCA2 F</b>	5'-TCTGACTTTCGTTGGCTGTG-3'
<b>SERCA2 R</b>	5'-GATCATAATGACCCGGATGC-3'
<b>STIM2 F</b>	5'-ACCGGAGTCACAGACAGAAA-3'
<b>STIM2 R</b>	5'-CAATTATGAGGAGGGCGTGT-3'
<b>STX5 F</b>	5'-AGGATTTTCGTGAGAGCCAAG-3'
<b>STX5 R</b>	5'-TTTGAAGTCATTGGACATGGAGG-3'

A statisztikai elemzés SAS programmal történt, Delta Delta Ct módszer segítségével YWHAG génhez viszonyítottuk a vizsgált géneket.

### **3.3 Különböző érési fázisú petesejtek $\text{Ca}^{2+}$ szintjének mérése**

A különböző érési fázisú petesejtek kinyerése a „A sertés petesejtek  $\text{Ca}^{2+}$  – oszcillációját befolyásoló gének expressziója” fejezetben leírtak szerint történt.

A petesejteket  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes médiumban tartottuk, a mérés előtt 10  $\mu\text{M}$  CPA-val inkubáltuk 2 órán át (a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárainak kiürítése céljából) és fél órán át Fura 2-AM  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékelő festéket adtunk az oldathoz, hogy a petesejtekben jelen lévő  $\text{Ca}^{2+}$ -ot jelölje. A mérést egy Nikon Eclipse TE-2000U invertmikroszkóp és egy hozzá kapcsolt InCyt Im2 fluoreszcencia-detektáló rendszer segítségével végeztük. A kezdeti, kb. 30 mp-es alap  $\text{Ca}^{2+}$  szint-mérés után a petesejthez emelt  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú (10 mM) oldatot adtunk és tovább folytattuk a mérést.

## 4 Eredmények

### 4.1 Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa

Az enzimes emésztést követően az agaróz gélen történt szeparálás után a következő fragmenteket kaptuk A allél - 127 bp, B allél - 92, 35 bp.

Megállapíthattuk, hogy mangalicában is jelen van a prolaktin receptor génjének polimorfizmusa és az A allél van összefüggésben a nagyobb alomszámmal. Az AA genotípusú egyedek 2,21 malaccal többet fialtak a BB genotípusúaknál, és a populáció átlagos alomméretét 1,33, az AB genotípusú egyedekét pedig 1,77 malaccal haladták meg.

A három genotípus szignifikánsan ( $p < 0,005$ ) eltér egymástól. Az AA magasabb alomszámmal van összefüggésben, mint az AB illetve BB, viszont az AB és a BB genotípusok közt nem mutatható ki szignifikáns különbség ( $p > 0,005$ ).

Az A allél gyakorisága (mangalicánál 32%), valamint az AA genotípusú egyedek (mangalicánál 8%) hányada a populációban kisebb, és ez összhangban van más kutatók eredményeivel. Javasolható, hogy szelekcióval növeljék az A allél gyakoriságát, így várhatóan növekedni fog az alomszám is.

Az AA genotípust hordozó egyedeknek volt a legmagasabb az alomszáma, a BB genotípusú egyedeké a legkisebb. A kísérletekben az AB genotípusú egyedek is kisebb termelési eredményeket mutattak, mint az AA genotípusú egyedek.

### 4.2 A sertés petesejtek $Ca^{2+}$ – oszcillációját befolyásoló gének expressziója

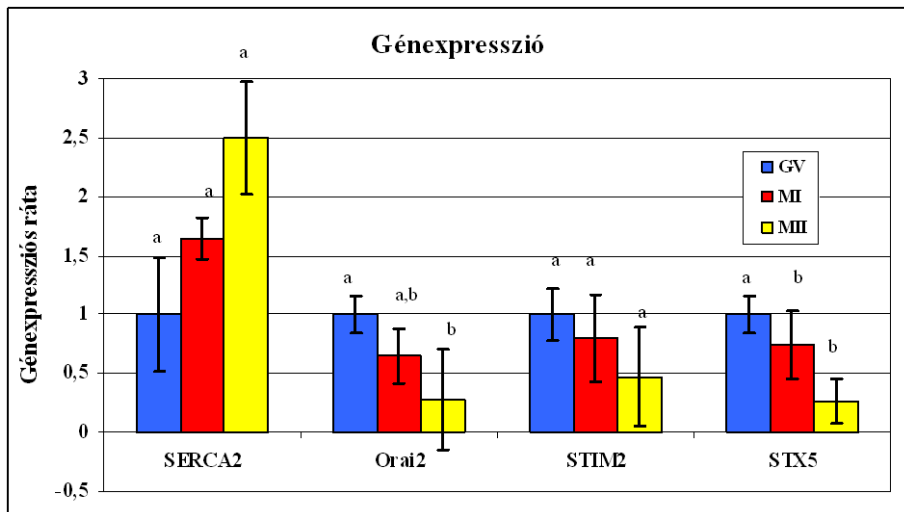
A kezdeti primerekkel létrehozott PCR termékek nagysága: SERCA2 493 bp, Orai2 441 bp, STIM2 497 bp, STX5 499 bp.

A tervezett RT-PCR termékek hosszai a következők voltak: SERCA2 103 bp, STIM2 82 bp, Orai2 106 bp és STX5 114 bp.

A statisztikai analízis során két gén expressziójában volt tapasztalható szignifikáns eltérés a különböző fejlettségű petesejtek között ( $p < 0,05$ ). A SERCA2 és STIM2 gének esetében nem volt tapasztalható szignifikáns változás, míg az Orai2 és STX5 gének kifejeződése csökkent a maturálatás során.

A 1. ábrán a génextpressziós különbségek láthatók génenként (SERCA2, Orai2, STIM2, STX5) és a petesejt-fejlődési csoportonként (GV, MI, MII). A szignifikáns különbségeket a különböző betűk jelentik (<sup>a, b</sup>).





1. ábra. A vizsgált gének expressziós értékeinek különbségei GV, MI és MII állapotú petesejtnél.

(<sup>a,b</sup> az értékek közti szignifikáns különbséget jelöli;  $P < 0,05$ )

A SERCA2 gén expressziójának változatlanságát az indokolhatja, hogy az ER raktár szerepe a petesejt érése során minden stádiumban egyaránt fontos, valamint ez a sejt szervecské egyéj sejt kommunikációs folyamatokban is részt vesz. A SERCA2 a SERCA változatok közül a legérzékenyebb a  $Ca^{2+}$ -ra.

A STIM2 és Orai2 fehérjék szerepe még nem teljesen tisztázott, de a kísérletek alapján a STIM2-nek hasonló szerepe van, mint a STIM1-nek, bár főként a szabályozás (gátlás) a feladata és az Orai2 is hasonló - bár gyengébb - funkciót tölt be, mint az Orai1.

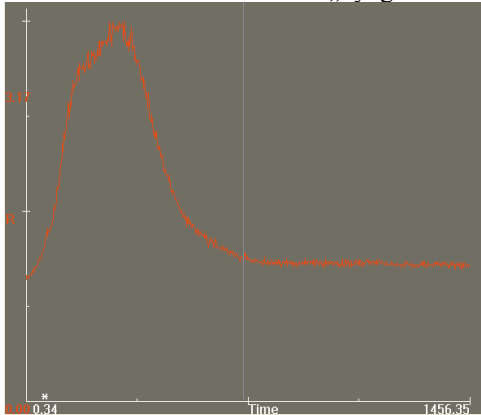
A STIM fehérjék dimereket illetve oligomereket képezve kapcsolódnak az Orai fehérjékhez, amint az ER raktár kiürül s csak így nyílnak meg a plazmamembrán  $Ca^{2+}$  csatornái. A STIM1 túlexpresszálatása önmagában nem volt hatással a  $Ca^{2+}$  beáramlására, míg Orai1-gyel közösen túlexpresszálatva jelentősen megnövelte azt. Ezzel szemben a STIM2 az Orai1-gyel közösen túlexpresszálatva gátolta a  $Ca^{2+}$  beáramlást a raktárak kiürülését követően, bár mások azt találták, hogy lényegesen nagyobb STIM2 szint közösen az Orai1-gyel képes volt megnövekedett  $Ca^{2+}$  áramot előidézni.

Úgy tűnik tehát, hogy az Orai és STIM fehérjék aránya meghatározó a  $Ca^{2+}$ -beáramlás szempontjából. A két fehérje együttes túlexpresszálatása megnövekedett  $Ca^{2+}$ -áramlást eredményezett, míg az egyenkénti túlexpresszálatás gátolta a SOCE-t. Saját eredmények alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. Éretlen petesejtek - melyekben magas az Orai2 szint a STIM1 szintjéhez képest - nem mutatnak hosszan tartó  $Ca^{2+}$ -oszcillációt spermiummal való fúziót követően. Az érés során csökken az Orai fehérjék STIM-hez viszonyított aránya a sejtekben, és feltehetőleg ennek következtében ezen petesejtekben a termékenyítést végző spermium órákig tartó  $Ca^{2+}$ -oszcillációt képes előidézni.

A syntaxin 5 gén expressziójának csökkenésére az a magyarázat, hogy fehérjéje a policisztin-2 fehérjével kapcsolódva gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -áramlást az ER membránon. Így csökkenése indokolt, mivel az oszcilláció során a raktárakból kiáramló  $\text{Ca}^{2+}$  felelős elsődlegesen a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál létrehozásában.

### 4.3 Különböző érési fázisú petesejtek $\text{Ca}^{2+}$ szintjének mérése

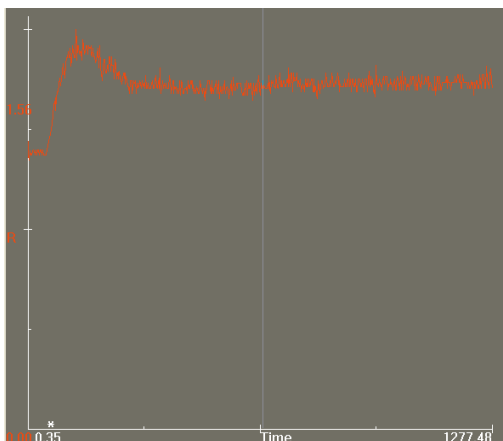
A három eltérő fejlettségű petesejtnél a következő eredményeket kaptuk: GV és MI állapotban kevésbé váltható ki a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlása, míg MII fázisban lényeges emelkedést mutatott a kezdeti „nyugalmi”  $\text{Ca}^{2+}$  szint (2. 3. 4. ábra).



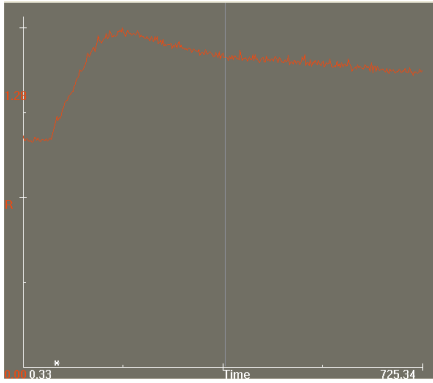
2. ábra. MII petesejtben  $10 \mu\text{M}$  CPA és  $10 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  csúcs.

Ez a hirtelen  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedés alkalmas lehet egy későbbi kémiai aktiválás elindítására.

Ez az emelkedés az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  sejtbe történő beáramlásának eredménye és a sejt  $\text{Ca}^{2+}$  raktárainak kiürülése váltotta ki (sejtraktárak által szabályozott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás).



3. ábra. GV petesejtben 10  $\mu\text{M}$  CPA és 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  által okozott  $\text{Ca}^{2+}$  csúcs.  
Az eredmény tehát azt bizonyítja, hogy érett petesejtben jelentős  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás követi a raktárak kiürülését; ez lényeges a raktárak újratöltéséhez és a spermium által előidézett, hosszan tartó  $\text{Ca}^{2+}$  oszcilláció fenntartásához. GV és MI fázisban lévő petesejtek esetében nem következett be jelentős  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás a raktárak kiürítését követően; ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy éretlen petesejtben a spermium csak rövid idejű  $\text{Ca}^{2+}$  jelet képes előidézni.



4. ábra. MI petesejtben 10  $\mu\text{M}$  CPA és 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás.

## 5 Új tudományos eredmények

- 1) A mangalica fajtában is jelen van a prolaktin receptor génjének polimorfizmusa és a különböző allélok eltérő hatással vannak az alomszám alakulására. Vizsgálataink alapján az A allélt hordozó, illetve az AA genotípusú kocák több malacot fialnak, ám kisebb arányban vannak jelen a populációban. Szelekcióval, a másik allél megtartásával érdemes lenne növelni ezt az arányt, hogy az alomszám növekedhessen.
- 2) A sertés petesejtekben a  $Ca^{2+}$ -oszcillációt befolyásoló gének közül a négy vizsgált gén különböző mértékben expresszálódik a különböző fejlődési stádiumokban. A syntaxin 5 és az Orai 2 expressziója csökken, míg a STIM 2 és a SERCA 2 nem változik szignifikánsan. Ezeket a géneket még nem vizsgálták sertés petesejtekben.
- 3) Érett sertés petesejtekben a  $Ca^{2+}$ -raktárak kiürítése  $Ca^{2+}$  beáramlást idéz elő a sejtmembránon keresztül CPA-val (ciklopiazonsav) történt blokkolást, majd emelt  $Ca^{2+}$  koncentrációjú oldat hozzáadását követően. A beáramlás mértéke növekszik a petesejtek érésével egyidőben és ez lényeges a megtermékenyítést követően, az embriófejlődést kiváltó  $Ca^{2+}$ -jelek előidézésének szempontjából. CPA-val történt blokkolást követően először mi végeztük el a  $Ca^{2+}$  beáramlásának mérését sertés petesejtekben.

## **6 Lektorált lapokban megjelent tudományos közlemények:**

**Wang C - Lee K. - Gajdócsi E - Papp AB - Machaty Z. (2012):** Orail mediated store-operated  $Ca^{2+}$  entry during fertilization in mammalian oocytes. Developmental Biology. 2012 365(2):414-23. (IF: 4,069)

**Gajdócsi Erzsébet. – Kiho Lee – Chunmin Wang – John M. Challie – Bali Papp Ágnes – Macháty Zoltán (2010):** A sertés petesejtek calcium oszcillációját befolyásoló gének expressziója. Magyar Állatorvosok Lapja 2011/2 104-107 (IF: 0,201)

**Pataki R. – Gajdócsi E. – Kiss R. - Tempfli K. - Varga E. - Konrád Sz. - Bali Papp Á.(2009):** A prolaktin receptor gén alomszámra gyakorolt hatásának vizsgálata a mangalica sertésekben. Acta Agronomica Óváriensis, 51 73-82.

**Gajdócsi E. – Bali Papp Á. (2009):** Sertés géntérképezés, Magyar Állatorvosok Lapja 2009/3, 148 (IF: 0,2)

**Gajdócsi E – Pataki R – Tempfli K – Bali Papp Á (2008):** A prolaktin receptor gén hatása a mangalicák alomméretére. Animal welfare, etológia és tartástechnológia, Gödöllő, Vol.4. Is. 2.

**Varga E. –Petz Makkosné B. –Gajdócsi E.–Salamon I. –Bali Papp Á. (2008):** Vitriification of in vitro matured oocytes of Mangalica (Hungarian native breed pig) and Large White pig. Acta Veterinaria Hungarica 56 (3) (IF: 0,535)

**IF:5,005**

## 7 Konferencia kiadványokban megjelent közlemények

**Nánássy L.- Gajdócsi E. – Dudás B. – Antal F. – Vereczkey A. (2013):** Evaluation of the efficiency of in vitro fertilization combined with Preimplantation Genetic Screening in a small setup. COGI konferencia, Vienna 2013.okt. 24-27 (poszter)

**E. Gajdócsi – K. Lee – C. Wang – J.M. Challie – Á. Bali Papp – Z. Macháty (2011):** Expression of genes influencing the calcium oscillation in pig oocytes. ESDAR konferencia, Antalya, Törökország, 2011. szept. 15-17. (poszter)

**Gajdócsi Erzsébet – Kiho Lee – Chunmin Wang – John M. Challie – Bali Papp Ágnes – Macháty Zoltán (2010):** A sertés petesejtek calcium oszcillációját befolyásoló gének expressziója. 16. Szaporodásbiológiai Találkozó, Visegrád, 2010. okt.29-30. (előadás)

**Gajdócsi Erzsébet. – Kiho Lee – Chunmin Wang – John M. Challie – Bali Papp Ágnes – Macháty Zoltán (2010):** A kalcium-hullámok génextpressziója sertés petesejtekben. Óvári Tudományos Nap, Mosonmagyaróvár, 2010. okt. 7. (poszter)

**E. Gajdócsi – R. Pataki – R. Kiss – K. Tempfli – Á. Bali Papp (2008):** Connection of prolactin receptor gene with Mangalica pigs' litter-size. XXXII. Óvári Tudományos Napok, Mosonmagyaróvár, 9<sup>th</sup> October 2008 (poszter)

**E. Gajdócsi – R. Pataki – Á. Bali Papp (2008):** The effect of the gene of prolactin receptor on Mangalica pigs' litter-size. Second European Conference on Pig Genomics. Pig Genome II. , Ljubjana, 4-5<sup>th</sup> June (poszter)

**Gajdócsi E – Pataki R – Tempfli K – Bali Papp Á (2008):** A prolaktin receptor gén hatása a mangalicák alomméretére. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok. Gödöllő, április 11-12. (poszter)

**Gajdócsi E.– Pataki R. – Bali Papp Á. (2007):** Az alomszámot befolyásoló gének vizsgálata sertés fajban. XXVIII. OTDK Agrártudományi szekció. Debrecen, április 16-18. (előadás)

**Pataki R. - Gajdócsi E – Varga E. - Bali Papp Á (2007):** Az alomszámot befolyásoló gének vizsgálata sertésben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus. XIV. Sejt –és Fejlődésbiológiai Napok. Balatonfüred, április 15-17. (poszter)

**Varga E – Gajdócsi E – Bali Papp Á (2006):** Különböző fajtájú sertés petesejtek vitrifikációs hűtése, visszaolvasztás utáni fertilizációja és az embriók fejlődése. Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon. Budapest, MTA Székház, szeptember 29. (előadás)

**Varga E –Gajdócsi E – Bali Papp Á (2006):** In vitro maturált sertés petesejtek aktiválása. XXXI. Óvári Tudományos Nap „Élelmiszeralapanyag előállítás - Quo vadis?” Mosonmagyaróvár, október 6. Előadások és poszterek összefoglaló anyaga 64. (poszter)